

TP - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

untel

INTRODUCTION

La mitochondrie est un organite cellulaire d'origine endosymbiotique dont le but est de fournir de l'énergie à la Cellule par catabolisme (la respiration cellulaire). Au cours de la respiration, le glucose est d'abord dégradé en pyruvate dans le cytoplasme, puis, une fois dans la mitochondrie, ce pyruvate réagira pour former de l'Acétyl-CoA qui pourra être dégradé en dioxyde de carbone par l'intermédiaire du cycle de Krebs (cf figure 1).

La fermentation est une autre possibilité pour générer de l'énergie et correspond au catabolisme du glucose, dans le cytoplasme, en milieu anaérobique et ne fait pas intervenir la mitochondrie. Elle permet la dégradation partielle du glucose en acide lactique et ne permet la synthèse que de 2 ATP par molécule de glucose. La respiration, elle, peut produire 36 ATP, d'où son importance pour les cellules eucaryotes, grandes consommatrices d'énergie.

Notre but sera de mettre en évidence les réactions d'oxydo-réduction du métabolisme respiratoire, sur des fractions mitochondriales.

Pour cela, nous allons devoir libérer les mitochondries contenues dans les cellules de pomme de terre, éclater leur membrane et exposer leur membrane interne. Ensuite, nous allons bloquer la chaîne respiratoire au niveau du complexe IV, puis nous apprécierons l'évolution de la quantité de cytochrome c réduit en fonction du temps.

MÉTHODES

Préparation des mitochondries (cf figure 2)

On choisit de travailler sur des pommes de terres épluchées car la pelure contient des chloroplastes de même poids moléculaire que les mitochondries qui absorbent la lumière et donc risqueraient de parasiter les résultats. On utilise ensuite du tampon tris pour préserver nos fractions mitochondriales des variations de pH qui pourraient les inhiber. On s'assure que la solution ait une concentration en saccharose inférieure à la concentration en saccharose des cellules afin que l'eau entre dans les cellules par Osmose jusqu'à les faire éclater. Une fois éclatées, les cellules vont libérer des lysosomes et autres éléments dégradants les protéines, on va donc les inhiber le maximum possible en utilisant de l'EDTA et de la BSA (qui vont se fixer aux protéases et les inhiber) et de la cystéine (qui seront dégradées par les protéases, en en mettant beaucoup en solution, on limite la dégradation des protéines nécessaire au TP) et en conservant l'échantillon au froid (on limite l'activité protéasique). On va commencer par mixer des cubes de pomme de Terre, le mixeur n'étant pas suffisamment efficace pour extraire les cellules des tissus, on va devoir purifier la solution en commençant par la filtrer pour éliminer les fragments de tissus. Ensuite, on va procéder à deux centrifugations successives qui vont sédimenter ce qui est le plus lourd (les débris mal mixés, les

noyaux et amyoplastes). On obtient donc une solution purifiée des gros éléments. On la centrifuge à 10 000rpm pendant 20 minutes pour récupérer une fraction de mitochondrie (on obtiendra aussi

des plastes et autres éléments de même poids moléculaire que les mitochondries mais sans activité à 550nm). On va ensuite utiliser une solution de « lavage » pour détruire la membrane externe des mitochondrie qui est plus perméable que la membrane interne. En centrifugeant on obtient un culot de mitochondries sans membranes externes. On va utiliser le potter pour détruire la membrane interne et exposer la surface interne de la membrane interne qui contient la chaîne respiratoire.

Mesure de l'activité « succinate-cytochrome c reductase »

On va utiliser du cyanure pour inhiber le complexe IV de la chaîne respiratoire et mener à l'accumulation de cytochrome C réduit par la réaction détaillé en figure 4. On retient que le réactif est, dans le cas de la réduction, le succinate et à pour produit le fumarate. Dans le cas où le complexe IV n'est pas inhibé, les réactifs sont le succinate et l'oxygène, et les produits sont le fumarate et l'eau. L'évolution de la réaction sera aisément constatable à 550nm, car seul le cytochrome C réduit(et un peu le cytochrome C oxydé) absorbent à cette longueur d'onde. Donc, en bloquant le complexe IV, on va augmenter la concentration en cytochrome C réduit, et donc augmenter l'absorbance à 550nm. Pour ce faire, on va ajouter du cytochrome C oxydé en plus de la fraction mitochondriale pour être sûr d'en avoir assez en solution. On va donc devoir faire le blanc en utilisant ce qui absorbe à 550nm (le cytochrome c oxydé et la fraction mitochondriale), on diluera dans du tampon phosphate dont le volume n'a pas d'importance. On prendra soin de réaliser une cuve témoin, qui nous montrera ce qui se passe en temps normal, sans inhiber au cyanure (cf figure 3).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Observations (cf figure 5)

Courbe 1 : Nous pouvons observer que la première courbe est en constante évolution. On peut diviser la courbe en 2 parties à environ 7 minutes, avant, la courbe ne croit pas linéairement ; après, la courbe devient linéaire. Entre 1 minute et 1 minute 30 secondes, il y a un léger décroissement de la courbe. Son origine est bien l'origine du repère.

Courbe 2 : La courbe 2 a une absorbance négative, son absorbance de départ est de -0,1. Elle décroît pendant 2 minutes, puis croit très légèrement le reste du temps. Elle a l'air de former un plateau à l'absorbance -0,1.

Analyse des résultats

Cuve 2 :

- La croissance de la courbe témoigne de ce que l'on voulait voir ; l'absorbance en augmentation signifie qu'il y a de plus en plus de cytochrome C réduit dans la cuve.
- L'augmentation de la vitesse de réduction de la solution signifie que la solution n'est pas parfaitement homogène et donc que tous les cytochrome C ne se sont pas entourés de succinate ou que toutes les molécules de cyanure n'ont pas rencontré de complexe IV, et

- donc que la réaction d'oxydation du cytochrome C se produit encore. Ainsi, à la vitesse de réduction maximale, tous les complexes IV ont été désactivés par le cyanure et tous les

complexes II et III réduisent le cytochrome C suivant leur charge maximale, c'est la fraction mitochondriale qui est le réactif limitant de cette réaction.

- Le léger décroissement de la courbe à 1 minute 30 secondes, signifie que le rayon lumineux qui traverse la cuve rencontre des éléments qui absorbent, la diminution soudaine et courte d'absorption ne pouvant pas s'expliquer par l'oxydation du cytochrome C, on peut imaginer que des floccules sédimentent dans la cuve. Ces floccules ont du se former dans le tube de la fraction mitochondriale et montrent qu la fraction n'est pas pure. La partie de la courbe se situant avant 2 minutes, n'est donc pas représentative des réactions d'oxydo-réduction du milieu mais de la floculation.
- L'origine de la courbe coïncidant avec l'origine du repère montre que les manipulations se sont correctement déroulées, le blanc est correct.

Cuve 3 :

- L'origine de la courbe à une absorbance négative, cela peut signifier qu'il y a moins de cytochrome C oxydé que prévu, car il absorbe quand même à 550nm, on ne se retrouve donc plus dans les conditions du blanc. Peut être dû un oubli des expérimentateurs ou bien un mauvais pipetage, qui a du être réalisé sur le fond du tube à essais qui présentait un gradient de concentration pour les divers solutés.
- La décroissance de la courbe peut s'expliquer, comme pour la courbe précédente, par une floculation.
- La légère croissance de la courbe n'était pas attendue, on aurait pu s'attendre à ce que la courbe croît et décroît successivement, la solution ne pouvant pas être parfaitement homogène et toutes les réactions de réductions ne pouvant pas parfaitement compenser les réactions d'oxydation. L'augmentation faible mais régulière montre qu'un sens de réaction est plus efficace, c'est le sens de la réduction. Cela peut s'expliquer par une plus forte présence de molécule de succinate que d'atomes d'oxygènes ou une homogénéisation non parfaite.
- En effet, la courbe à l'air de former un plateau, on peut imaginer que la courbe stabilise après 20 minutes, étant parfaitement homogène, il y a autant de cytochrome C qui se réduisent que de cytochrome C qui s'oxydent, ou peut être que la courbe aurait finalement décroît pour recroître ensuite et former la courbe sinusoïdale à laquelle on s'attendait.

CONCLUSION

On en conclut que l'inhibition du complexe IV augmentant la quantité de cytochrome C réduit, la respiration met bien en jeu des réactions d'oxydo-réduction., et que la fraction mitochondrial à une capacité de travail limitant la rapidité de réduction de la solution. On s'est heurté à des problèmes de floculation qui ont parasité les courbes dans les premières minutes que l'on aurait put éviter en homogénéisant la solution avant pipetage. La dernière cuve à été contaminée, on aurait put corriger ce résultat en recommençant l'expérimentation.

FIGURE 3 : préparation des cuves

	Cuve 1 (blanc)	Cuve 2	Cuve 3 (témoin)
Cyanure	x	0,1 ml	x
Succinate	x	0,1 ml	0,1 ml
Cytochrome C oxydé	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Tampon phosphate	0,8 ml	0,6 ml	0,7ml
Fraction mitochondriale	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Volume total	1 ml	1 ml	1 ml

FIGURE 4 : réaction d'oxydo-réduction

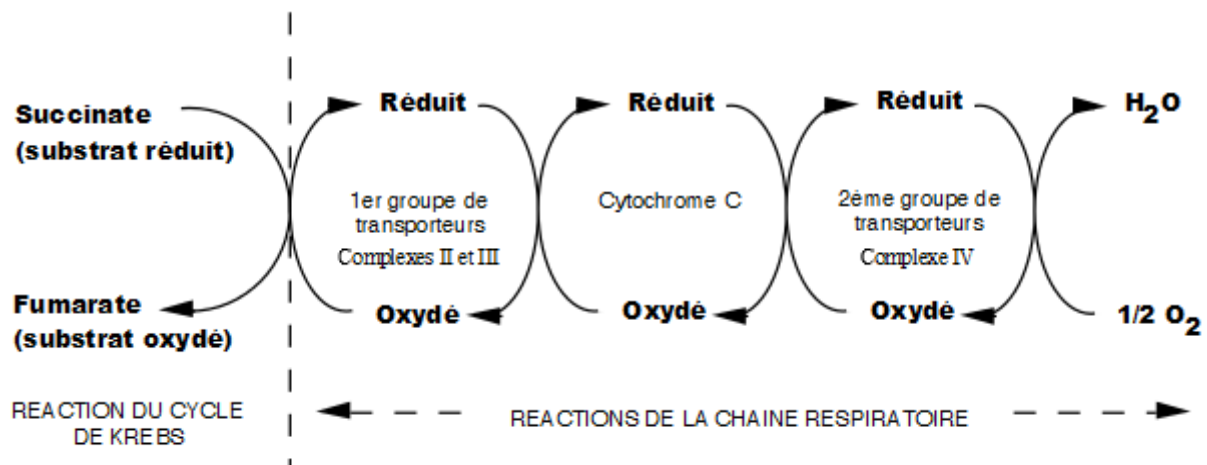


FIGURE 5

L'évolution de l'absorbance dans le temps à 550nm

